

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Agnes Drmić
7100/BT

ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST GLJIVE
Ganoderma lucidum

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 2

Mentor: Izv. prof. dr. sc. *Sunčica Beluhan*

Zagreb, 2018.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,
Industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST GLJIVE *Ganoderma lucidum*

Agnes Drmić, 7100/BT

Sažetak: *Ganoderma lucidum* ima dugu povijesnu ulogu u tradicionalnoj medicini Kine i Japana kao gljiva za koju se smatra da produžuje život i poboljšava zdravlje. Ta se gljiva diljem svijeta proučava zbog njenog udjela polisaharida, posebice β -glukana i triterpena. U ovom radu je proučavana antioksidacijska aktivnost i udjel ukupnih fenolnih spojeva u vodenim i etanolnim ekstraktima micelija i plodišta (bazidiokarpa) *G. lucidum*. Za dokazivanje antioksidacijskih aktivnosti ekstrakata provedena su tri određivanja: redukcijska snaga, sposobnost vezanja radikala i uspješnost keliranja iona željeza. Ekstrakti micelija pokazali su se učinkovitijima pri sposobnosti vezanja slobodnih DPPH radikala nego ekstrakti plodišta *G. lucidum*, no ekstrakti plodišta su imali puno bolju sposobnost keliranja iona željeza. Rezultatima ovog istraživanja je potvrđeno da su i micelij i plodište gljive *G. lucidum* izvrsni izvor antioksidacijskih sastojaka.

Ključne riječi: *Ganoderma lucidum*, bioaktivni sastojci, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 40 stranica, 10 slika, 7 tablica, 65 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan*

Datum obrane: srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Biotechnology

Department of Biochemical engineering
Laboratory for Biochemical Engineering,
Industrial Microbiology, Brewing and Malting Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MUSHROOM *Ganoderma lucidum*

Agnes Drmić, 7100/BT

Abstract: Having a long historical past in traditional Chinese and Japanese medicine, *Ganoderma lucidum* is a type of mushroom believed to extend life and promote health. *G. lucidum* is a mushroom worldwide studied due to its polysaccharide contents, particularly β -glucans and triterpenes. The antioxidant activity and total phenolic contents of water and ethanolic extracts of *G. lucidum* in mycelia and mature fruiting body (basidiocarp) were evaluated in this work. Three complementary assays, reducing power, radical scavenging capacity and the chelating ability for ferrous ions were used to screen the antioxidant properties of extracts. The mycelia extracts were more effective in DPPH radical scavenging activity than the fruiting body of *G. lucidum* extracts, but fruiting body extracts were more effective in the ferrous ion chelating ability. Results support the use of both mycelia and mature fruiting body of *G. lucidum* as excellent sources of antioxidant compounds.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, bioactive compounds, antioxidant activity

Thesis contains: 40 pages, 10 figures, 7 tables, 65 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

Defence date: July 2018

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. <i>Reishi</i>	2
2.2. Vrste <i>Reishi</i> gljiva	4
2.2.1. Crna <i>Reishi</i> gljiva	4
2.2.2. Ljubičasta <i>Reishi</i> gljiva	5
2.2.3. Crvena <i>Reishi</i> gljiva	5
2.3. Fizičke značajke crvenih <i>Reishi</i> gljiva	5
2.4. Kemijski sastav crvenih <i>Reishi</i> gljiva	6
2.4.1. Polisaharidi i peptidoglikani	7
2.4.2. Triterpeni	8
2.5. Zdravstveni učinci crvene <i>Reishi</i> gljive	10
2.5.1. Učinci povezani s cirkulacijom krvi	11
2.5.2. Učinci povezani s bolestima srca i krvožilnim sustavom	11
2.5.3. Učinci povezani s poremećajima u radu jetre	11
2.5.4. Poremećaji probavnog sustava	12
2.5.5. Prevencija plućnih bolesti	12
2.5.6. Regulacija bubrežnih funkcija	12
2.5.7. Antitumorsko djelovanje	12
2.5.8. Učinci u borbi protiv dijabetesa	13
2.5.9. Prevencija bolesti prostate	13
3. MATERIJALI I METODE RADA.....	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Uzorci gljive	14
3.1.2. Hranjiva podloga za uzgoj micelija	15
3.1.3. Standardi i reagensi	16
3.1.4. Reagensi za određivanje ukupnih fenola	16
3.2. Aparati	16
3.3. Metode istraživanja	17
3.3.1. Analitičke metode	17
3.3.1.1. Suha tvar gljiva	17
3.3.1.2. Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka	17
3.3.1.2.1. Ekstrakcija vrućom vodom	18
3.3.1.2.2. Ekstrakcija etanolom	18
3.3.1.3. Određivanje β -karotena i likopena	18
3.3.1.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta	18
3.3.1.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola	19
3.3.1.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	19

3.3.1.3.3. Određivanje reducirajuće snage	19
3.3.1.3.4. Sposobnost keliranja iona željeza	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
5. ZAKLJUČCI.....	26
6. LITERATURA	27

1. UVOD

Ganoderma lucidum, u Kini poznata kao Ling-zhi, a u Japanu kao *Reishi*, gljiva je koja se stoljećima smatra u Aziji promotorom zdravlja i dugog života. U kineskoj narodnoj medicini se ova gljiva primjenjuje u obliku praha i čaja više od 2000 godina (Tang i sur. 2007). Ima glatku površinu klobuka, drvenastu strukturu, a jedna od vrsta i tamno crvenu boju klobuka. Samo ime „lucidus“ govori da je vrlo pametna ili bistra. Kako je *G. lucidum* u prirodnom okružju vrlo teško naći, u začetcima spoznavanja njenih ljekovitih svojstava, ova je gljiva bila povlastica samo bogatim ljudima.

Posljednjih godina ova gljiva je zainteresirala brojne znanstvenike zbog antitumorskog djelovanja. Istraživanja su pokazala da djelotvorne supstance utječu na inhibiciju rasta tumorskih stanica i poticanje njihove apoptoze kod leukemije, limfoma i mijeloma (Muller i sur. 2006). *Reishi* je klasificirana kao medicinska gljiva čije plodište karakteriziraju brojne aktivne supstancije koje imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. *G. lucidum* je posebno bogat izvor bioaktivnih spojeva, koja se nalaze u miceliju, sporama i plodištu.

U Hrvatskoj je *G. lucidum* poznata kao Hrastova sjajnica, no vrlo ju se rijetko može naći u prirodi. U plodištu se nalaze esencijalne i neesencijalne aminokiseline, organske kiseline, polisaharidi, beta glukani, triterpeni, kumarini, saponini, fitoncidi, vitamini: C (osobito), B3, B5 i D, a od mikro i makroelemenata: germanij, kalcij, natrij, magnezij, željezo, mangan, fosfor, cink, bakar, sumpor, selen, srebro i dr.

U ovom su radu određivana antioksidacijska svojstva medicinske gljive *G. lucidum*. Pokusi su bili podijeljeni i provedeni u 3 nezavisne faze kako bi se:

- 1) odredio prinos ekstrakta iz gljive nakon ekstrakcije s dva ekstrakcijska sredstva; vrućom vodom i etanolom,
- 2) provela ekstrakcija bioaktivnih sastojaka (ukupni fenoli), istražila antioksidacijska svojstva gljiva (udjel askorbinske kiseline, β -karotena i likopena),
- 3) te reducirajuća snaga i EC_{50} vrijednost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Reishi*

Reishi (*Ganoderma lucidum*) je gljiva koja se u Kini više od 2000 godina naziva „Božjom biljkom“. Prepoznatljiva je pod nazivom, Ling Zhi, što se prevodi kao „biljka s duhovnom snagom“. *Reishi* je cijenjena zbog učinkovitosti u liječenju širokog spektra bolesti, zbog čega su carevi gotovo svih kineskih dinastija svojim slugama naređivali potragu za divljim *Reishi* gljivama koje su se mogle pronaći samo na vrhovima udaljenih planinskih lanaca. Tradicionalno upotreba temelji se na antitumorskom, antimikrobnom, antifungalnom i antivirusnom djelovanju (Boh i sur., 2007). Vjerovalo se da će *Reishi* gljive, onome tko ih konzumira, osigurati vječnu mladost i pojačano zdravlje. Međutim, zbog udaljenog staništa i nedostatka visokokvalitetnih uzoraka, korištenje *Reishi* u medicinske svrhe bilo je rezervirano za plemstvo i bogate pojedince. U drugoj polovici 20.- tog stoljeća počela se provoditi kontinuirana kultivacija kojom je omogućeno da ova rijetka biljka bude dostupna širim masama odnosno pučanstvu (McMeekin, 2005).

Otac kineske medicine Shen Nong, koji je bio član Han dinastije, napisao je knjigu o orijentalnoj medicini koja se originalno zove „*Herbal Pharmacopoeia*“ (Wasser i Weis, 1997). U knjizi je opisao 365 vrsta biljaka koje su klasificirane u tri kategorije. U prvu kategoriju je ubrojeno 120 biljaka koje se još nazivaju vrhunskim biljkama jer su netoksične i pogodne za korištenje kroz duži vremenski period. Pripisuju im se ljekovita svojstva, a navodi se i da sprječavaju starenje. To su: azijski ginseng (*Panax ginseng*), sladić (*Glycyrrhiza uralensis*) i mnoge druge. Drugu kategoriju čini 120 biljaka koje su ocijenjene kao prosječne. Neke od njih su toksične, a navodi se da su vrlo uspješne u suzbijanju rasta patogena i u sprječavanju širenja malarije. U ovu kategoriju su ubrojene: kozlinac (*Astragalus propinquus*), kineska anđelika (*Angelica sinensis*), kositernica (*Ephedra sinica*) i druge. U posljednjoj kategoriji je navedeno 125 biljnih vrsta koje su iznimno toksične, pa se primjenjuju za učinkovito liječenje bolesti. Zbog toksičnosti, a posljedično i zbog brojnih nuspojava, korištenje ove skupine biljaka je ograničeno na kraći vremenski period. U ovoj kategoriji se nalaze: jedić (*Aconitum carmichaelii*) i kozlačevke (*Pinellia ternata*) (Wang i sur., 1999). Klasifikacija se temeljila na dva osnovna kriterija: prednosti korištenja biljke, koje su se određivale na temelju kontinuirane potrošnje, a drugi kriterij su nuspojave. One biljke koje su svrstane u najvišu kategoriju, odnosno ocijenjene kao vrhunske, imaju moć uskladiti funkcije tijela, duha i uma. Raspon bolesti koje su te biljke liječile je veći u odnosu na bolesti koje su liječile biljke iz

druge dvije kategorije. Osim toga, biljke iz prve kategorije morale su imati neznajne i kratkoročne nuspojave, inače nisu mogle biti ubrojene u prvu kategoriju (Wong, 2003).

Od svih biljaka koje su ocijenjene kao vrhunske, *Reishi* je opisan kao najdjelotvorniji, čak superiorniji i od poznatog ginsenga, koji se još naziva i „korijenom života.“ U djelu „*Compendium of Materia Medica*“, koju je napisao Ben Cao Gang Mu, opisano je stotine prirodnih lijekova koje su Kinezi koristili tisućama godina. Cijenjeni doktor i prirodoslovac Li Shi Zhen (1518.- 1593.) opisao je prednosti *Reishi*-a: „Poboljšava životnu energiju i pozitivno djeluje na zdravlje. Ako se koristi kroz duži vremenski period pospješuje pokretljivost tijela, a životni vijek se produžuje na onaj besmrtnih vila.“

Reishi se tijekom godina sve više prikazivao u orijentalnoj umjetnosti i kulturi zbog prestižnog statusa u tradicionalnoj kineskoj medicini (McMeekin, 2005). Pojavljivao se na portretima kineskih vladara, na različitim slikama, vezovima, zgradama i skulpturama bogova kao simbol božanstva, dugovječnosti i sreće (Wasser i sur., 2005). Prikazi *Reishi*-a bili su izloženi u Zabranjenom gradu, nekadašnjoj carskoj palači kineskih dinastija Ming i Qing, i u Ljetnoj palači u Pekingu kao svjedočanstvo njegove vrijednosti. Njezin prepoznatljiv oblik bio je omiljen simbol kojeg su koristili plemići i bogati pučani što potvrđuje i to da je tradicionalno žezlo kineskih careva bilo u obliku *Reishi* gljive, a naziva se „Ru Yi“ (Upton, 2000).

Reishi je bila od davnina ovjekovječena kao vrhunska ljekovita gljiva koja se sve češće spominjala u mitologiji i bajkama. U bajci „Bijela zmija“ braće Grimm, misteriozna junakinja je bogovima ukrala ljekovitu gljivu *Reishi* kako bi spasila život svome ljubavniku. Nebeska bitka za *Reishi* se može usporediti s bitkama opisanima u Homerovoj Ilijadi. Priča je to koja je poznata gotovo svakom Kinezu (Wong, 2003).

2.2. Vrste *Reishi* gljiva

Poznato je više od 2000 vrsta *Reishi* gljiva, ali je samo njih šest detaljno proučeno kako bi se otkrili potencijalni zdravstveni učinci: crvena, crna, plava, bijela, žuta i ljubičasta (Woo i sur., 1999). Od navedenih vrsta, crvena i crna *Reishi* imaju najdjelotvornije učinke na ljudsko zdravlje, zbog čega se koriste kao dodatak prehrani diljem svijeta (Wasser i sur., 2005).



Slika 1. Šest vrsta *Reishi* gljiva (Wong, 2003)

2.2.1. Crna *Reishi* gljiva

Crna *Reishi* (*Ganoderma sinensis*) je za razliku od ostalih vrsta *Reishi* gljiva uobičajena i može se pronaći u većini kineskih biljnih trgovina. Ova vrsta *Ganoderma*-e se može pronaći u različitim oblicima i promjerima i do 25 centimetara. Biljni tonik koji se od nje priprema sadrži mnogobrojna pozitivna svojstva i većina proizvoda dostupnih na tržištu sadrže upravo crnu *Reishi*. Međutim, i dalje se smatra inferiornijom u odnosu na crvenu *Reishi* zbog manjeg sadržaja polisaharida.

2.2.2. Ljubičasta *Reishi* gljiva

Divlji ljubičasti *Reishi* raste na planini Chang Bai, koja se nalazi sjeverno od Sjeverne Koreje u provinciji Jilin u Kini. Jako je rijetka i izgledom slična crvenoj *Reishi*, ali ima uočljivo ljubičasto obojenje u središtu kape. Istraživanja na ovoj vrsti su ograničena zbog malog broja autentičnih primjeraka gljive.

2.2.3. Crvena *Reishi* gljiva

Visok sadržaj polisaharida čini crvene *Reishi* gljive vrlo cijenjenima. Dokazano je da je najučinkovitija u poboljšavanju cjelokupnog zdravlja. Koristi se za jačanje imunološkog sustava, tjelesnih funkcija i vitalnih organa.

Međutim, broj primjeraka visokokvalitetne crvene *Reishi* koji uspiju doseći punu zrelost je jako mali, a razlog tomu su: oštri okolišni uvjeti, osjetljivost na zagađenja u okolišu, bolesti i napade insekata kao i nestabilnost divljih jedinki. Kao posljedicu toga, prije 30 godina znanstvenici i poljoprivrednici su počeli eksperimentirati s različitim metodama kultivacije kojom bi se osigurala dovoljna količina crvene *Reishi* za širu populaciju. Umjetna kultivacija postignuta je korištenjem supstrata kao što su: žitarice, piljevina, drveni trupci (Chang i Buswell, 1999), te pluteni ostaci (Riu i sur., 1997). Japanski proizvođači su tada stekli reputaciju i danas se smatra da proizvode najkvalitetniju crvenu *Reishi*. Današnji cijenjeni status mogu zahvaliti strogim propisima koje je propisala japanska vlada s ciljem održavanja kvalitete i trgovinskih standarda.

Također je zabilježeno da su optimalni uvjeti uzgoja micelija pri 30°C -35°C i pH 4 – 4.5, a dodatak masnih kiselina ubrzava micelijski rast i proizvodnju bioaktivnih komponenti (Yang i Liau, 1998).

2.3. Fizičke značajke crvenih *Reishi* gljiva

Budući da su gljive postale sastavni dio zdrave prehrane, prikupljene su mnogobrojne informacije o njenim biološkim karakteristikama.

Tijelo crvene *Reishi* gljive sastoji se od tri glavna dijela: klobuka u obliku bubrega, stabljike i spora.

Stabljika gljive izvlači hranjive tvari iz drveta na kojem raste. Gljive obično u prirodi cvjetaju na suhim deblima uvele šljive, hrasta (*Quercus serrata*) ili noćurka (*Pasonia brunoniana*),

što nije slučaj s crvenom *Reishi* koja se u Japanu kultivira tako da se gljivice presađuju na stari japanski hrast. Kvaliteta crvenih *Reishi* gljiva ovisi o hranjivim tvarima koje su prisutne u njenom staništu. Količina dostupnih nutrijenata određuje veličinu gljivinog klobuka. Kako crveni *Reishi* dozrijeva, spore se proizvode i ispuštaju u zrak. Zbog vrlo tvrde vanjske ljuske spora, klijanje je otežano što doprinosi malom broju zrelih gljiva u prirodi (Wong, 2003).

2.4. Kemijski sastav crvenih *Reishi* gljiva

Najveći udio od 90% gljive čini voda. Preostalih 10% su: 10-40% proteini, 2-8% masti, 3-28% ugljikohidrati, 3-32% vlakna, 8-10% pepeo, vitamini i minerali bogati kalijem, kalcijem, fosforom, magnezijem, selenijem, željezom, cinkom i bakrom (Borchers i sur., 1999). Analizom je utvrđeno da su netopljive komponente gljive: 1.8% pepeo, 26-28% ugljikohidrati, 3-5% sirova masa, 59% vlakna i 7-8% proteini (Mau i sur., 2001). Crvene *Reishi* gljive sadrže široku paletu bioaktivnih komponenti poput: terpenoida, sterola, fenola, nukleotida i njihovih derivata, glikoproteina i polisaharida. Proteini nađeni u gljivi sadrže sve esencijalne aminokiseline, a posebno su bogati lizinom i leucinom. Nizak udio masnoća i visok udio polinezasićenih masnih kiselina u odnosu na ukupne masne kiseline povećavaju doprinosi zdravstvenoj vrijednosti *Reishi* gljiva (Chang i Buswell, 1996; Borchers i sur., 1999; Sanodiya i sur., 2009). Polisaharidi, peptidoglikani i triterpeni su tri glavne fiziološki aktivne komponente u gljivi *Ganoderma lucidum* (Boh i sur., 2007; Zhou i sur., 2007). Međutim, postotak svake komponente se može značajno razlikovati ovisno o načinu uzgoja, kao što je prikazano u Tablici 1. U jedanaest nasumično odabranih komercijalnih proizvoda *Reishi* gljive analiziran je udio dviju najvažnijih aktivnih komponenti, terpena i polisaharida. Utvrđeno je da je udio triterpena varira od naznatne do 7.8%, a sadržaj polisaharida je u rasponu od 1.1 do 15.8% (Chang i Buswell, 2008). Ovakve razlike mogu se pojaviti iz nekoliko razloga koji uključuju razlike u vrstama ili sojevima korištene gljive kao i razlike u proizvodnim metodama.

Istraživanja su pokazala da su polisaharidi najaktivniji elementi pronađeni u gljivi, te da stimuliraju jačanje imunološkog sustava ljudi. Liječnici u Kini i Japanu su godinama koristili ginseng, brazeniju i kozlinac, koji kao i crvena *Reishi* imaju visok sadržaj polisaharida, kako bi smanjili nuspojave kemoterapije kod pacijenata oboljelih od tumora. Također je dokazano da ganoderma kiselina ublažava alergijske reakcije inhibirajući kemijskog uzročnika upale (Jiang i sur., 2008). Osim izuzetno visokog udjela polisaharida, nije utvrđeno postojanje

nekog drugog sastojka kojem bi se pripisali izvanredni zdravstveni učinci. Vjerojatnije je da je za djelotvornost biljke odgovorna kombinacija svih prisutnih kemijskih sastojaka.

Tablica 1. Udjel terpena i polisaharida u 11 komercijalno dostupnih preparata *Reishi* gljive (Chang i Buswell, 2008)

Tip proizvoda	Terpeni (%)	Polisaharidi (%)
A (biljni ekstrakt)	1.36	4.48
B (biljni ekstrakt)	2.36	5.32
C (biljni ekstrakt)	1.88	15.70
D (biljni ekstrakt)	1.06	10.97
E (biljni ekstrakt)	0.44	7.51
F (biljni ekstrakt)	1.78	6.18
G (biljni ekstrakt)	1.44	13.30
H (biljni ekstrakt)	0.50	15.80
I (biljni ekstrakt)	7.82	7.66
J (biljni prah)	0.46	1.10
K (micelijski prah)	Nije detektirano	12.78

2.4.1. Polisaharidi i peptidoglikani

Reishi gljive su bogate različitim polisaharidnim strukturama velike molekulske mase, a bioaktivni peptidoglikan se nalazi u svim dijelovima gljive. Polisaharidi predstavljaju strukturno različite biološke makromolekule sa širokim rasponom svojstava (Zhou i sur., 2007). Različiti polisaharidi su izolirani iz plodnog tijela, spora i micelija gljive. Navodi se da polisaharidi pokazuju širok raspon bioaktivnosti, uključujući protuupalno, hipoglikemijsko, antitumorsko i imunostimulirajuće djelovanje (Miyazaki i Nishijima, 1981; Hikino i sur., 1985; Tomoda i sur. 1986; Bao i sur. 2001; Wachtel-Galor i sur., 2004). Polisaharidi se izoliraju ekstrakcijom vrućom vodom, a zatim taloženjem s etanolom ili metanolom. Strukturne analize su pokazale da je glukoza najzastupljeniji šećer (Bao i sur., 2001; Wang i sur., 2002). Međutim, ispitivanja su potvrdila i prisutnost drugih heteropolimera koji sadrže ksilozu, manozu, galaktozu i fukozu (Bao i sur., 2002). Gljiva se sastoji i od polisaharida hitina, koji je u ljudskom organizmu nerazgradiv i djelomično je odgovoran za fizičku tvrdoću gljive (Upton, 2000).

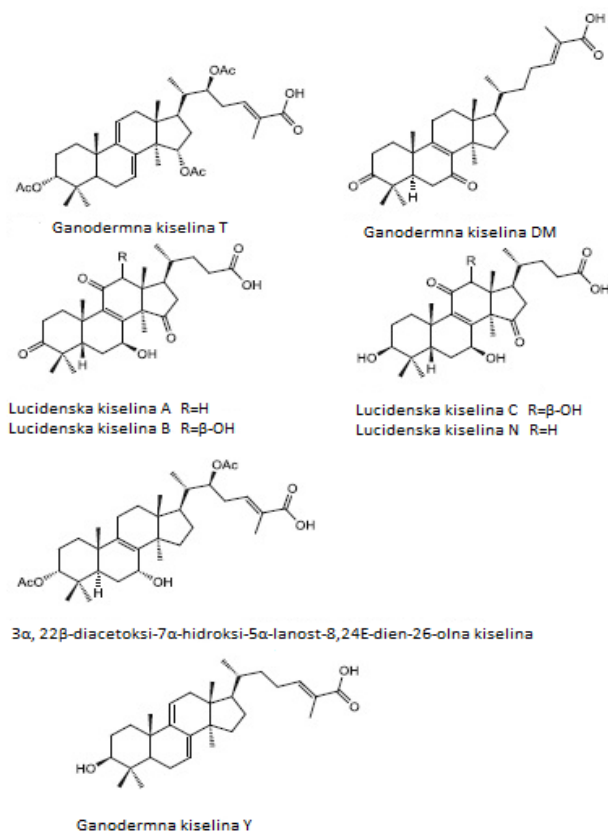
2.4.2. Triterpeni

Terpeni su hlapljivi nezasićeni ugljikovodici ugodnog mirisa. Ovi spojevi su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu. Dokazano je njihovo protuupalno, antitumorsko i hipolipidemijsko djelovanje. Terpeni izolirani iz biljaka kao što su ružmarin (*Rosmarinus officinalis*) i ginseng (*Panax ginseng*) pridonijeli su zdravstvenim učincima tih biljaka (Mahato i Sen, 1997; Mashour i sur., 1998; Haralampidis i sur., 2002).

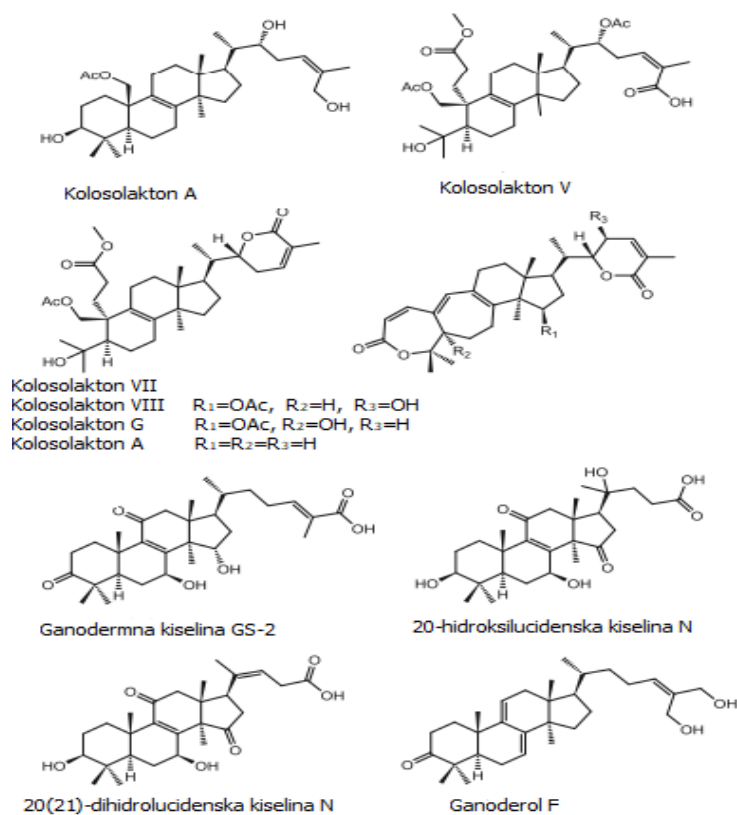
Triterpeni su podskupina terpena koji imaju molekulsku masu u rasponu od 400 do 600 kDa (Mahato i Sen, 1997; Zhou i sur., 2007). Mnoge biljne vrste sintetiziraju triterpene svojim metaboličkim reakcijama, često u obliku lateksa i smola koji pridonose otpornosti biljke od bolesti. Bez obzira na ubrzan napredak znanosti, do danas nije otkriveno kojim biokemijskim putevima se odvija biosinteza triterpena.

Ganoderma lucidum je bogata triterpenima, koji su odgovorni za gorak okus biljke, te koji utječu na snižavanje koncentracije lipida i koji imaju antioksidacijsko djelovanje. Međutim, koncentracija triterpena je različita ovisno o dijelovima i o rastućim stadijima gljive. Sadržaj triterpena može poslužiti kao mjera kvalitete različitih uzoraka Reishi gljive (Chen i sur., 1999).

Kemijska struktura triterpena u *Reishi* gljivi temelji se na lanostanu, koji je metabolit lanosterola, čija se biosinteza temelji na ciklizaciji skvalena (Haralampidis i sur., 2002). Ekstrakcija triterpena se obično provodi s metanolom, etanolom, acetonom, kloroformom, eterom ili smjesom tih otapala. Ekstrakti se mogu dalje pročistiti različitim postupcima koji uključuju klasični ili reverzno fazni HPLC (Chen i sur., 1999; Su i sur., 2001). Prvi triterpeni izolirani iz gljive *Ganoderma lucidum* su ganodermna kiselina A i B (Kubota i sur., 1982). Od 1982. godine i otkrića ganodermne kiseline A i B, iz *Reishi* gljiva izolirano je više od 100 triterpena s poznatim kemijskim strukturama i molekulskim konfiguracijama. Među njima, više od 50 triterpena su jedinstveni za ovu gljivu. Veliku većinu čine ganodermna i lucidenska kiselina, ali su identificirani i drugi triterpeni kao što su ganoderali i ganoderoli (Nishitoba i sur., 1984; Sato i sur., 1986; Gonzalez i sur., 1999; Ma i sur., 2002; Akihisa i sur., 2007; Zhou i sur., 2007).



Slika 2. Kemijska struktura triterpena s antitumorskom aktivnošću (Silva i sur.,2013)



Slika 3. Kemijska struktura antiviralnih triterpena (Silva i sur.,2013)

Tablica 2. Bioaktivne komponente s antitumorskim djelovanjem (Silva i sur., 2013)

Naziv gljive	Bioaktivne komponente	Biološka aktivnost	Reference
<i>Ganoderma lucidum</i>	Ganoderмна kiselina Me (ganoderмni derivat)	Smanjenje tumorskog rasta	Chen i sur., (2008)
	Ganoderмна kiselina A, F i H	Inhibicija: 1. ekspresije CDK4 2. izlučivanje uPa 3. adhezije, migracije i rasta	Jiang i sur., (2008)
	Ganoderмна kiselina DM	Antiproliferativni učinak	Wu i sur., (2012)
	Lucidenska kiselina A, B, A i N	Inhibicija: 1.PMA- inducirana aktivnost MMP-9 2.rasta	Weng i sur., (2007)
	Ganoderмна kiselina T Ganoderмна kiselina F	Antimetastatski učinak	Xu i sur., (2010), Tang i sur., (2006)
	11 β -hidroksi-3,7-dioksi-5 α -lanosta-8,24(E)-dien-26-olna kiselina 4,4,14 α -trimetil-3,7-dioksi-5 α -kol-8-en-24-olna kiselina Etil ester 12 β -acetoksi-3,7,11,15,23-pentoksi-5 α -lanosta-8-en-26-olne kiseline	Citotoksičan učinak	Cheng i sur., (2010)

2.5. Zdravstveni učinci crvene *Reishi* gljive

Potrošnja crvene *Reishi* povezana je s liječenjem širokog spektra bolesti, od astme do herpesa zoster. Studije pokazuju da primjena vodenog ekstrakta gljive *G. lucidum* (36 do 72 g suhe tvari na dan) značajno utječe na smanjenje boli kod pacijenata s postherpetičkom neuralgijom i kod pacijenata zaraženih virusom zoster (Hijikata i sur., 1998). Neki proizvođači koriste te informacije kako bi dokazali da se crvena *Reishi* može izravno koristiti za liječenje mnogobrojnih bolesti, mada za takve navode nema medicinskog uporišta. Međutim, mnoga znanstvena istraživanja upućuju na pozitivne učinke crvene *Reishi* kao nutritivnog dodatka koji može pomoći pri normalizaciji i regulaciji tjelesnih funkcija (Wasser i Weis, 1999).

2.5.1. Učinci povezani s cirkulacijom krvi

Pretpostavka je da ekstrakt crvene *Reishi* gljive, upravo kao i aspirin, može reducirati zgrušavanje krvi smanjenjem agregacije trombocita odnosno stanica koje tvore ugrušak (Tao i sur., 1990). Osim toga, postoji mogućnost transformacije crvenih krvnih stanica što ih može učiniti savitljivijima za transport kroz krvne žile, na taj način smanjujući šanse začepljenja krvnih žila koje u pravilu dovode do moždanih i srčanih udara. Poboljšana cirkulacija je iznimno važna kod dijabetičara koji često razvijaju arterijske bolesti.

2.5.2. Učinci povezani s bolestima srca i krvožilnim sustavom

Postoji nekoliko prednosti korištenja crvene *Reishi* gljive kod kardiovaskularnih oboljenja:

- ispravljanje aritmije prouzročene stresom
- snižavanje LDL-kolesterola
- snižavanje krvnog tlaka
- poboljšana cirkulacija krvi.

Istraživanja provedena na životinjama ukazala su da vodeni ekstrakt micelija gljive *Ganoderma lucidum* utječe na smanjenje sistoličkog i dijastoličkog krvnog tlaka (Lee i Rhee, 1990).

2.5.3. Učinci povezani s poremećajima u radu jetre

Primarna funkcija jetre je metabolizacija i detoksifikacija lijekova i otrova, te sinteza određenih proteina i kolesterola. Oštećenja jetre mogu prouzročiti nakupljanje toksina i drugih nusproizvoda metabolizma u tijelu koji uzrokuju žuticu, gubitak težine, umor, gubitak apetita i mnoge druge bolesti. Istraživanja su pokazala da crvena *Reishi* ima hepatološka svojstva, odnosno da kontinuiranom primjenom može doći do pomlađivanja stanica jetre što joj omogućuje da nastavi obavljati svoje vitalne funkcije (Kim i sur., 1999). Ganoderma kiselina i njezini derivati djeluju kao inhibitori sinteze kolesterola (Komoda i sur., 1989).

2.5.4. Poremećaji probavnog sustava

Korištenje crvene *Reishi* povezano je sa smanjenjem želučane kiseline, koja u suvišku može dovesti do stvaranja peptidnih i želučanih čireva. Dokazano je da regulira peristaltiku crijeva, ublažava simptome zatvora i dijareje (Hong i sur., 2004).

2.5.5. Prevencija plućnih bolesti

Prednosti primjene crvene *Reishi* uočene su kod osoba oboljelih od astme, kroničnog bronhitisa i alergija. Simptomi astme mogu se ublažiti blokiranjem posrednika upale i jačanjem imunološkog sustava što rezultira smanjenjem pojave prehlade i gripe. Proizvodi crvene *Reishi* koriste se za suzbijanje učestalog kašlja i kao sredstvo za iskašljavanje koje ubrzava izlučivanje sekreta. Smatra se da crveni *Reishi* poboljšava regeneraciju dušnika i epitela dišnih puteva- što je osobito važno kod pacijenata koji koriste duhanske proizvode i koji boluju od kroničnog bronhitisa.

2.5.6. Regulacija bubrežnih funkcija

Bubrezi su odgovorni za održavanje ravnoteže između kemikalija i tvari poput natrija, kalija i drugih elektrolita u tijelu. Osim navedene funkcije bubrezi provode: filtraciju krvi, održavaju konstantnu kiselost (pH) i molarnu koncentraciju tvari. Crvena *Reishi* može pomoći u regulaciji funkcija bubrega.

2.5.7. Antitumorsko djelovanje

Tumorske stanice su karakteristične zbog svog nekontroliranog rasta. Iako još uvijek nije jasno kako zdrave stanice postaju tumorske, određene pretpostavke sugeriraju da do takvog ponašanja dolazi zbog virusnog podrijetla, promjena tijekom prirodne obrane organizma. Danas se smatra da pojedinci imaju genetske predispozicije za oboljenje od tumora, stoga ne iznenađuje da u određenoj životnoj dobi imunološki sustav slabi i pojedinac postaje osjetljiviji. (Sliva i sur., 2003). Redovitom primjenom crvene *Reishi* stimulira se proizvodnja interferona i interleukina I i II koji su potencijalne prirodne antitumorske tvari koje proizvodi sam organizam (Wang i sur., 1997). Nadalje, istraživači tvrde da polisaharidi: β -1,3-D-glukan i β -1,6-D-glukan imaju snažna antitumorska svojstva. Navedeni polisaharidi mogu aktivirati

makrofage, koji su bitna imunološka obrana od mikrobnih uzročnika bolesti poput virusa, bakterija i kvasaca (Wasser i Weis, 1999).

2.5.8. Učinci u borbi protiv dijabetesa

Dijabetes je bolest tijekom koje tijelo ne može regulirati razinu glukoze u krvi jer gušterača ne proizvodi inzulin ili proizvedeni inzulin nije djelotvoran u organizmu. Postoje dvije vrste dijabetesa: dijabetes tipa I i dijabetes tipa II. Kod dijabetesa tipa I gušterača uopće ne proizvodi inzulin jer su joj uništene beta stanice koje ga stvaraju. Do toga dovode autoimune reakcije kod kojih imunološki sustav smatra da su beta stanice strano tijelo te ih napada, odnosno uništava. Kod dijabetesa tipa II, organizam proizvodi inzulin, ali ne u dovoljnim količinama. Ovaj tip dijabetesa je povezan s pretilošću, lošom ishranom i nedostatkom vježbanja. Oslonac u liječenju dijabetesa je unos inzulina pomoću injekcija ili oralnih lijekova, no oba načina imaju određene nuspojave. Crvena *Reishi* gljiva ima tendenciju spuštanja razine glukoze u krvi bez nuspojava, u slučajevima dijabetesa tipa II (Hikino i sur., 1989).

2.5.9. Prevencija bolesti prostate

Kod muškaraca starije životne dobi dolazi do povećanja prostate, nazvane benigna hiperplazija prostate, koja može dovesti do smanjenja normalnog protoka urina i učestalog mokrenja. Osim navedenih problema, u starijoj životnoj dobi učestala je pojava raka prostate. Antigen specifičan za prostatu povećava se u oba slučaja, a koristi se za praćenje tijeka bolesti. Postoje dokazi da crvene *Reishi* u kombinaciji s drugim ljekovitim biljkama može smanjiti razinu specifičnih antigena prostate. Mehanizam djelovanja je nepoznat, a promjene se mogu uočiti već mjesec dana nakon početka primjene.

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci gljive

Uzorci gljive *G. lucidum* (hrastova sjajnica) nabavljeni su iz Fungi perfecti d.o.o. u Zagrebu u rujnu 2018. godine. Svježi uzorci su odmah izvagani, izrezani i stavljeni na sušenje 6 h pri 50 °C (Slika 4). Nakon sušenja, uzorci su usitnjeni i pripremljeni za ekstrakciju (Slika 5).



Slika 4. Fotografija plodišta istraživane crvene gljive *G. lucidum* (fotografirala Agnes Drmić)



Slika 5. Fotografija usitnjenog plodišta istraživane crvene gljive *G. lucidum* (fotografirala Agnes Drmić)

3.1.2. Hranjiva podloga za uzgoj micelija

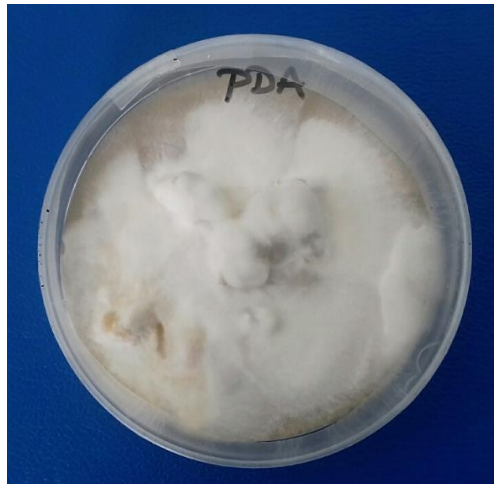
Nabavljeni micelij gljive *G. lucidum* bio je naciepljen na zrna pšenice koja su naknadno naciepljena na PDA podlogu (eng. potato dekstroze agar) sljedećeg sastava:

Tablica 3. Sastav PDA podloge

Sastojci	Koncentracija g/L
krumpir	250
dekstroza	18
agar-agar	20

Priprava podloge:

Krumpir je opran pod tekućom vodom, oguljen, narezan na sitne kockice i kuhan u 600 mL destilirane vode 25 – 30 minuta dok nije postao potpuno mekan. Kuhani krumpir je u vodi miksano do pirea, nakon čega je suspenzija pirea u vodi procijeđena kroz cjedilo pokriveno gazom kako bi se dobio ekstrakt u koji je dodana dekstroza. Dobivenoj podlozi je dodana destilirana voda, agar-agar, te je pH podešen na 5.5 – 6.0. Podloga je sterilizirana autoklavanjem pri 121 °C/20 minuta.



Slika 6. Fotografija uzgojenog micelija istraživane crvene gljive *G. lucidum* (fotografirala Agnes Drmić)

3.1.3. Standardi i reagensi

Kalijev dihidrogen fosfat, dikalijev hidrogen fosfat, kalijev ferocijanid, željezni klorid, klorovodična kiselina, trikloroctena kiselina, octena kiselina, pirogalol i Folin-Ciocalteu reagens nabavljeni su od Mercka (Darmstadt, Germany). Galna kiselina, metafosforna kiselina, (+)-katehin, 2,6-diklifenolindofenol, L-askorbinska kiselina, β -karoten, acetonitril, α -tokoferol, 2,2-difenil-1-pikrilhidranil radikal (DPPH), EDTA su nabavljeni od Sigmee (USA). Metanol, dikormetan, aceton, *n*-heksan, etil acetat, etanol, petroleter su bili proizvodi Kemike (Zagreb, Hrvatska).

3.1.4. Reagensi za određivanje ukupnih fenola

1. otapalo: destilirana voda, H₂O
2. Folin-Ciocalteu reagens
3. zasićena otopina natrijeva karbonata, Na₂CO₃

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopljeno je u 800 mL vruće destilirane vode, a potom ohlađeno na sobnu temperaturu. Dodano je nekoliko kristalića natrijeva karbonata, te u odmjernoj tikvici od 1000 mL nadopunjeno destiliranom vodom i nakon 24 sata filtrirano)

4. galna kiselina (0,03 g galne kiseline je otopljeno u etanolu u odmjernoj tikvici od 100 mL).

3.2. Aparati

- pH-metar

Pri radu je korišten ručni pH-metar "Hanna Instruments", model HI98103, SAD.

- Vage

Analitička vaga "Mettler", Švicarska

Digitalna analitička vaga "Shimadzu", Japan

Tehnička vaga "Tehtnica", ET 1211, 0-1200 g, Slovenija

- Sušionik

Za određivanje suhe tvari biomase i ekstrakata korišten je sušionik "Instrumentaria" ST-05, 50-200 °C, Hrvatska.

- Vibro mikser

Za homogenizaciju uzoraka korišten je vibrirajući mikser "Tehtnica EV-102", Železniki, Slovenija.

- Spektrofotometar

Za mjerenje apsorbancije korišten je spektrofotometar Unicam He·ios⁺, SAD.

3.3. Metode istraživanja

3.3.1. Analitičke metode

3.3.1.1. Suha tvar gljiva

Suha tvar gljiva određivana je sušenjem gljiva do konstantne mase pri 105 °C/24 h. Nakon hlađenja u eksikatoru, uzorci su izvagani, te je izračunata suha tvar u svakom uzorku (Alvarez i Enriquez, 1988).

Udjel suhe tvari, izražen u postotcima računat je prema jednadžbi:

$$w \text{ (s. tv. \%)} = [100 - (m_2 - m_3) / (m_2 - m_1)] \times 100 \quad (1)$$

w - maseni udjel suhe tvari u uzorku (%)

m₁ - masa prazne posude (g)

m₂ - masa posude i uzorka prije sušenja (g)

m₃ - masa posude i osušenog uzorka (g)

3.3.1.2. Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka

Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka iz plodišta proučavane gljive provedena je s dva ekstrakcijska sredstva: vodom pri 90 °C (10 minuta) i etanolom (95 %) pri 37 °C (Tsai i sur. (2007)).

3.3.1.2.1. Ekstrakcija vrućom vodom

3 g osušene gljive odvagano je s točnošću $\pm 0,1$ g i homogenizirano s 40 mL zagrijane destilirane vode (50 °C). Homogena smjesa ekstrahirana je 10 minuta pri temperaturi oko 90-95 °C uz povratno hladilo. Dobiveni ekstrakt je filtriran kroz filter papir, a zaostali talog ponovno je ekstrahiran s 20 mL destilirane vode uz povratno hladilo još 10 minuta. Dobiveni ekstrakti su spojeni u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopunjeni vodom do oznake.

3.3.1.2.2. Ekstrakcija etanolom

3 g osušene gljive odvagano je s točnošću $\pm 0,1$ g i homogenizirano s 40 mL etanola (95 %; 25 °C). Homogena smjesa ekstrahirana je 180 minuta pri 37 °C na magnetnoj miješalici (250 okr/min). Dobiveni ekstrakt je filtriran kroz filter papir, a zaostali talog ponovno je ekstrahiran s 40 mL etanola još 60 minuta. Dobiveni ekstrakti su spojeni u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopunjeni vodom do oznake.

3.3.1.3. Određivanje β -karotena i likopena

β -karoten (provitamin A) i likopen su ekstrahirani i određeni prema metodi Barros i sur. (2008). Uzorci suhih gljiva (100 mg) su 1 min miješani na vibrirajućoj miješalici s 10 mL smjese aceton:heksan (4:6) i nakon toga profiltrirani kroz filter papir. Filtratima je izmjerena apsorbancija na 453, 505 i 663 nm. Koncentracije β -karotena i likopena su izračunate prema jednadžbama:

$$\beta\text{-karoten (mg/100 mL)} = 0.216 \cdot A_{663} - 0.304 \cdot A_{505} + 0.452 \cdot A_{453}$$

$$\text{likopen (mg/100 mL)} = -0.0458 \cdot A_{663} + 0.372 \cdot A_{505} - 0.0806 \cdot A_{453}$$

3.3.1.4. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta

Antioksidansi su, po definiciji, sve one tvari koje u maloj količini u kratkom vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidanata. Slobodni radikal je svaki atom ili molekula koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini nestabilnim i veoma reaktivnim (sposobni oksidirati biološke molekule) (Tseng i Mau, 2007).

3.3.1.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

U epruvetu je otpipetirano 1 mL ekstrakta i 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa, nakon čega je smjesa homogenizirana na vibromikseru. Nakon 3 minute je reakcijskoj smjesi dodano 1 mL zasićene otopine Na_2CO_3 . Uzorak je ostavljen u mraku 90 minuta, nakon čega je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 725 nm (A_{725}) (Barros i sur., 2008). Na isti način je pripremljena i slijepa proba, ali je umjesto ekstrakta stavljena destilirana voda. Baždarni dijagram je izrađen s galnom kiselinom (0.01-0.4 mM; $R^2 = 0.9999$). Rezultati (mg galne kiseline/g ekstrakta gljive) su izračunati prema jednadžbi: $Y = 2.8557 \cdot X - 0.0021$.

3.3.1.3.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena je mjerenjem sposobnosti inhibicije slobodnog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Antioksidacijska sposobnost se mjeri u vidu otpuštanja vodika od strane antioksidansa odnosno sposobnosti vezivanja radikala pri čemu se koristi stabilan DPPH radikal (Cheung i sur., 2003).

U kivetu širine 1 cm pipetirano je 2 mL DPPH otopine i izmjerena početna apsorbanciju otopine radikala (A_0). U kivetu je potom dodana etanolna otopina (50 μL) uzorka, reakcijska smjesa je dobro promiješana i praćena je promjena apsorbancije tijekom jednog sata pri valnoj duljini od 517 nm. Antioksidacijska aktivnost uzorka mjerena je pri različitim razrjeđenjima (1:1; 1:10; 1:50; 1:100) pripremljenim s etilnim alkoholom. Za baždarenje spektrofotometra i određivanje nule u referentnoj kiveti korišten je čisti etanol.

Postotak inhibicije DPPH radikala uzoraka računat je prema jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije} = [1 - (A_{\text{uzorka}} - A_0)] \times 100 \quad (2)$$

A_{uzorka} – apsorbancija istraživanog uzorka na 517 nm

A_0 – apsorbancija slijepe probe na 517 nm

3.3.1.3.3. Određivanje reducirajuće snage

Reducirajuća snaga je određivana prema metodi Oyaizu (1986). Svaki od ekstrakata (0.1 – 30 mg/mL) je pomiješan s 2,5 mL 200 mM fosfatnog pufera (pH 6,6) i 2,5 mL kalijevog ferocijanida (10 mg/mL), te inkubiran pri 50 °C tijekom 20 minuta. Nakon toga je u uzorke

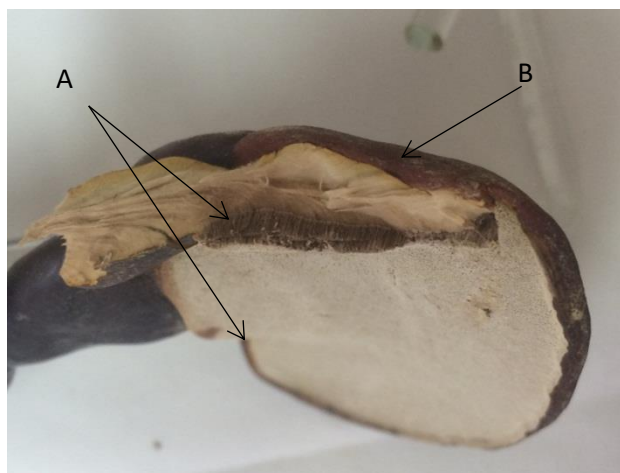
dodano 2.5 mL trikloroctene kiseline (100 mg/mL) te su centrifugirani pri 200 g/10 minuta. Gornji sloj (5 mL) je pomiješan s 5 mL deionizirane vode i 1 mL željeznog klorida (1 mg/mL), te je izmjerena apsorbancija na 700 nm. Veća vrijednost apsorbancije ukazala je na veću reducirajuću snagu. EC₅₀ vrijednosti (mg ekstrakta/mL) su koncentracije ekstrakta pri kojima je apsorbancija iznosila 1/2 vrijednosti apsorbancije izmjerene za reducirajuću snagu i dobivene su interpolacijom. Kao standardi su uporabljeni askorbinska kiselina i α-tokoferol.

3.3.1.3.4. Sposobnost keliranja iona željeza

Kelirajuća sposobnost određivana je prema metodi Dinisa i sur. (1994). Ekstrakti (0.1 – 30 mg/mL) su pomiješani s 3.7 mL metanola i 0,1 mL 2 mM željeznog klorida. Reakcija je pokrenuta dodatkom 0.2 mL 5 mM ferozina. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi (10 minuta), izmjerena je apsorbancija na 562 nm. Limunska kiselina i EDTA su uporabljene kao standardi.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Reishi gljiva (*G. lucidum*) u Hrvatskoj je poznata pod nazivom Hrastova sjajnica. Ova gljiva pripada stapčarkama iz koljena *Basidiomycetes* i porodice *Ganodermataceae* (Bibi i sur. 2009). Prepoznatljiva je po plosnatom, kožastom i tvrdom klobuku te sjajnoj crvenoj površini, kao i po visokoj morfološkoj plastičnosti koja varira ovisno o stadiju zrelosti bazidiokarpa. Donja strana klobuka je prekrivena porama kroz koje se otpuštaju spore, a ovisno o starosti gljive, može biti od bijele do smeđe boje (Slika 6).



Slika 7. Prikaz slojevitosti plodišta istraživane crvene *G. lucidum*. A) dvostruki sloj plodišta; B) crvena površina klobuka (fotografirala Agnes Drmić)

Ekstrakcija bioaktivnih sastojaka provedena je s dva ekstrakcijska sredstva; vrućom vodom i etanolom, s ciljem dobivanja ekstrakata koji sadrže spojeve velike molekulske mase, kao što su polisaharidi i male molekulske mase, koji su većinom fenolni spojevi. Obje vrste spojeva imaju važnu ulogu u medicinskom statusu gljiva (Ferreira i sur., 2010). Prinos ekstrakata iz plodišta i micelija gljive *G. lucidum* prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Prinos vodenih i etanolnih ekstrakata plodišta i micelija gljive *G. lucidum*

Stadij	Prinos ekstrakta (g/100 g s.tv.)	
	voda	etanol
plodište	40.05	15.21
micelij	12.01	5.21

Poznato je da su voće i povrće su bogati izvori antioksidanasa, kao što su vitamini A, C i E, karotenoidi, polifenolne supstancije i flavonoidi, koji štite od oštećenja slobodnim radikalima, te smanjuju rizik od kroničnih bolesti. U ovom radu jedan od ciljeva bio je ispitati antioksidacijska svojstva micelija i plodišta gljive *G. lucidum*, odnosno odrediti udjel askorbinske kiseline, β -karotena, α -tokoferola i ukupnih fenola, a rezultati su prikazani u Tablici 5.

Tablica 5. Maseni udjel (mg/g s. tv.) askorbinske kiseline, β -karotena, α -tokoferola i ukupnih fenola u ekstraktima gljiva (vruća voda i etanol)

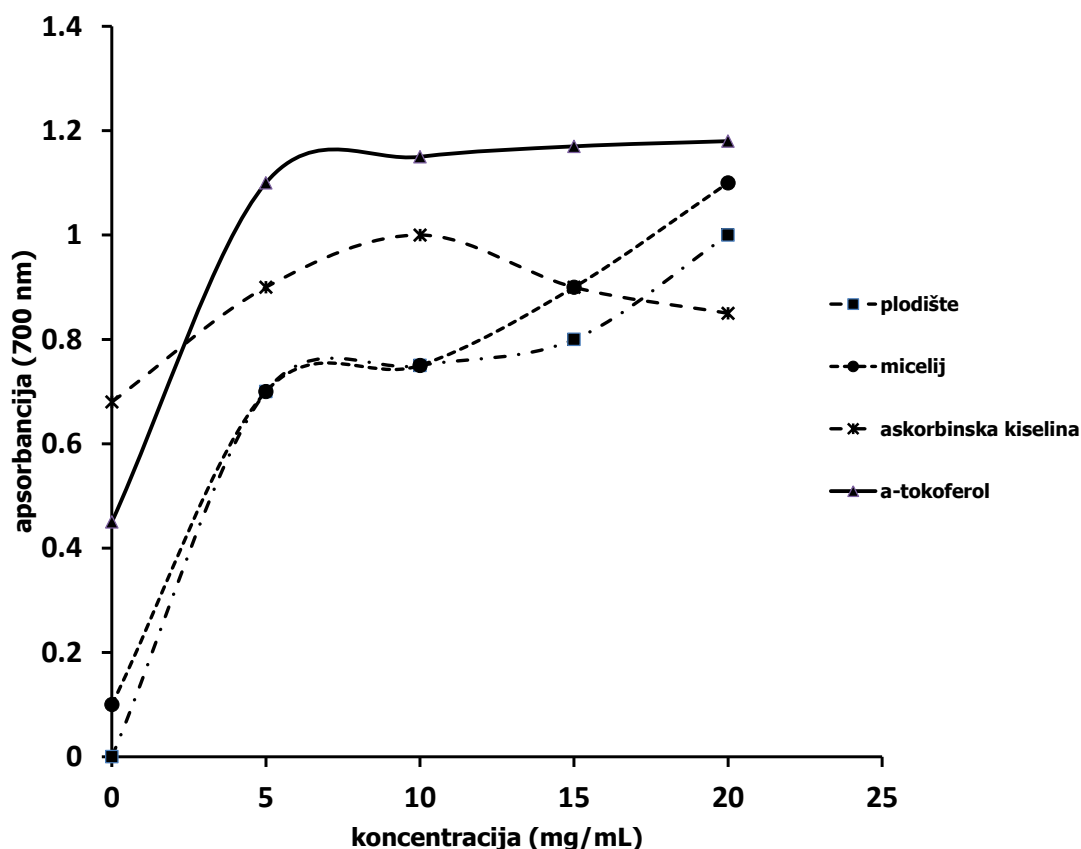
Vrsta gljiva	Maseni udjel (mg/g s.tv.)			
	Voda			
	Askorbinska	β-karoten	α-tokoferol	Ukupni
	kiselina			fenoli
plodište	171.23	no ^a	no	32.86
micelij	139.55	no	no	14.91
Etanol				
plodište	176.35	4.09	1.24	39.55
micelij	155.11	0.06	1.61	18.89

^ano = nije određeno

Istraživanja su pokazala da su vodeni ekstrakti micelija i plodišta pokazali vrlo visoku reducirajuću snagu (Tablica 6, Slika 7).

Tablica 6. Usporedni prikaz reducirajuće snage istraživanih vrsta gljiva

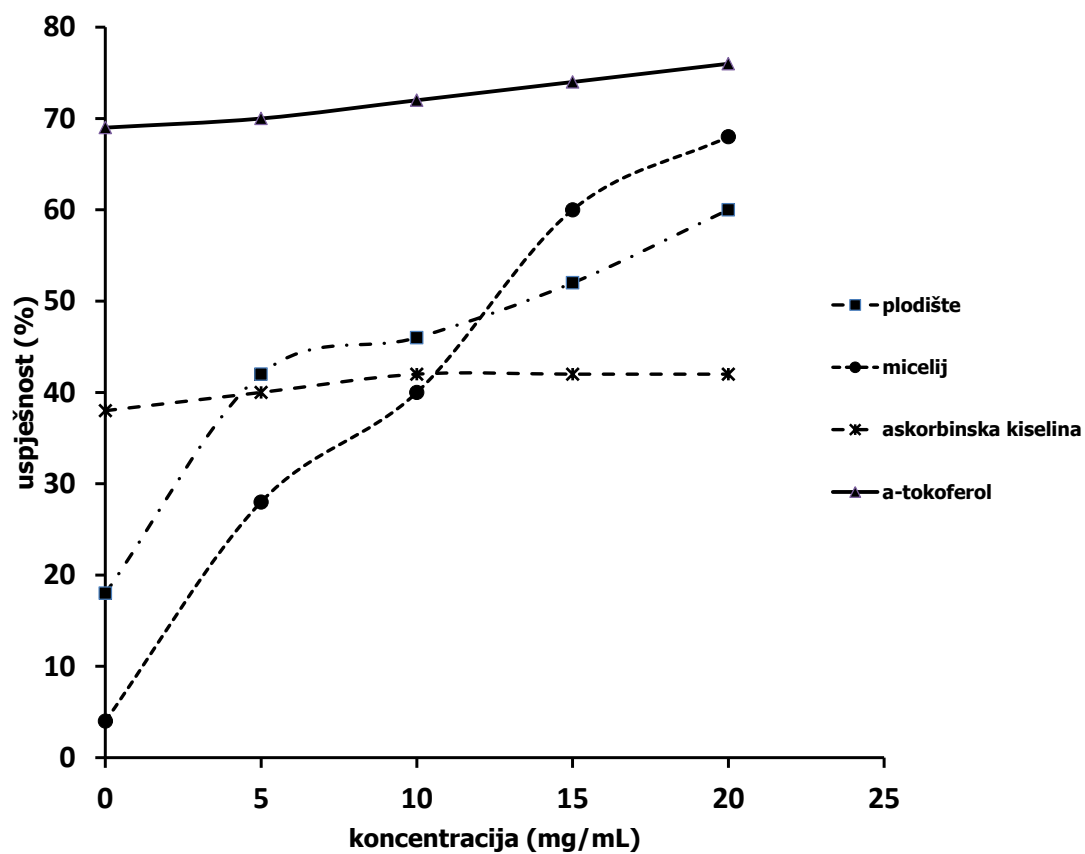
Stadij	Ukupna reducirajuća snaga (mg GK/g s. tv.)	
	voda	etanol
plodište	10.01	9.68
micelij	10.21	10.06



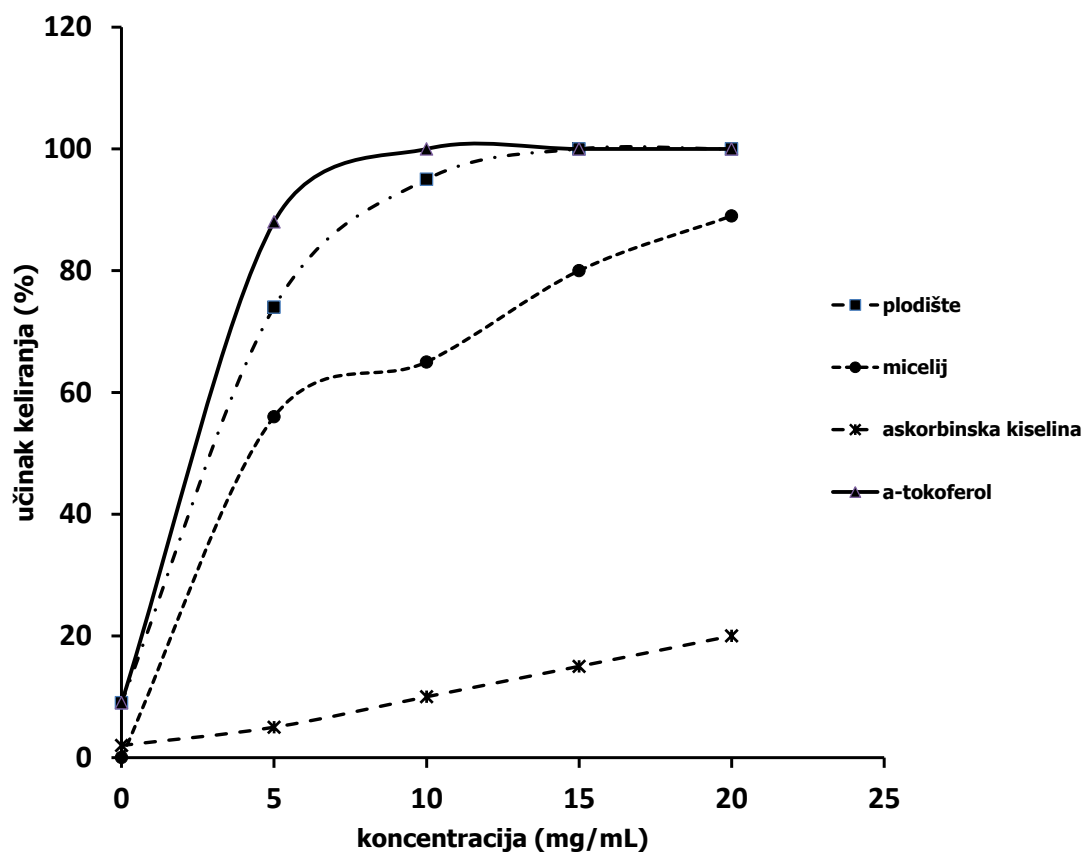
Slika 8. Reducirajuća snaga vodenih ekstrakata plodišta i micelija gljive *G. lucidum*

Gljive svojim delikatnim okusom i teksturom predstavljaju nutricionistički vrijednu hranu i važan izvor biološki aktivnih sastojaka koji imaju medicinsku vrijednost. Za gljive se općenito može reći da su nisko energetske namirnice vrlo bogate vlaknima (Yim i sur., 2009), te izvanredan izvor antioksidansa budući da nakupljaju različite sekundarne metabolite, uključujući i fenolne sastojke (Cheung i sur., 2003).

Antioksidacijska aktivnost prirodnih sastojaka se u posljednje vrijeme pojačano proučava zahvaljujući potražnji farmaceutskih i prehrambenih industrija, koje pokazuju sve veći interes za prirodne bioaktivne sastojke kojima se poboljšava ljudsko zdravlje (Smith i sur., 2002). Fenolni spojevi su glavni antioksidacijski sastojci kojima gljive obiluju, za razliku od drugih jakih antioksidansa (askorbinska kiselina, β -karoten, likopen i α -tokoferol) koji su u gljivama zastupljeni u relativno malim količinama (Barros i sur., 2008; Yang i sur., 2002).



Slika 9. Spособnost vezanja slobodnih radikala vodenih ekstrakata plodišta i micelija gljive *G. lucidum*



Slika 10. Spособnost keliranja željeza vodenih ekstrakata plodišta i micelija gljive *G. lucidum*

Plodište i micelij gljive *G. lucidum* su pokazale zadovoljavajuću antioksidacijsku aktivnost (Slike 7-9), pri čemu je micelij imao veće EC_{50} vrijednosti (od 0.42 do 11.98) u vodenim ekstraktima (Tablica 7).

Tablica 7. EC_{50} vrijednost vodenih ekstrakata plodišta i micelija gljive *G. lucidum*

Ekstrakt gljive	EC_{50} vrijednosti vodenih ekstrakata	
	plodište	micelij
antioksidacijska aktivnost	<0.1	0.42
reducirajuća snaga	0.92	3.99
sposobnost vezanja DPPH radikala	11.23	11.98
sposobnost vezanja iona željeza	0.73	4.66

5. ZAKLJUČCI

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

1. Biološki aktivne supstancije ekstrahirane su s dva ekstrakcijska sredstva: vrućom vodom (90 °C) i etanolom (37 °C). Bolji prinos ekstrakta postignut je ekstrakcijom s vrućom vodom i plodišta (40.05 g/100 g s.tv.) i micelija (12.01 g/100 g s. tv.), dok je s etanolom postignut prinos od 15.21 g/100 g s. tv. (plodište) i 5.21 g/100 g s.tv. (micelij).
2. Etanolni i vodeni ekstrakti plodišta i micelija gljive *G. lucidum* su vrlo bogati fenolnim spojevima, čiji su se maseni udjeli bili između 39.55 i 32.86 mg/g s. tv. (plodište), te 18.89 i 14.91 mg/g s. tv.
3. Udjeli askorbinske kiseline su bili vrlo visoki i u etanolnom i u vodenom ekstraktu (176.35 i 139.55 mg/g s.tv.). U vodenom ekstraktu nisu određeni udjeli β -karotena i α -tokoferola, dok su u etanolnom bili u plodištu 4.09 mg/g s.tv., a u miceliju 1.61 mg/g s.tv.
4. Sveobuhvatnim istraživanjima antioksidacijskih svojstava plodišta i micelija gljive *G. lucidum* dokazano je da je ova gljiva vrlo bogat izvor fitokemikalija, kao što su fenolni spojevi, askorbinska kiselina β -karoten i α -tokoferol, koji posjeduju važna antioksidacijska svojstva i čine *G. lucidum* jedinstvenom i visokovrijednom medicinskom gljivom.

6. LITERATURA

- Alvarez, R., Enriquez, A. (1988) Nucleic acid reduction in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**: 208-210.
- Akihisa, T., Nakamura, Y., Tagata, M., Tokuda, H., Yasukawa, K., Uchiyama, E., Suzuki, T., Kimura, Y. (2007) Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Chemistry & Biodiversity* **4(2)**:224–31
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. E., Ferreira, I. C. F. R. (2008) Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology* **46**: 2742-2747.
- Bao, X., Liu, C., Fang, J., Li, X. (2001) Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum*. *Carbohydrate Research* **332**:67–74
- Bao, X., Wang, X., Dong, Q., Fang, J., Li, X. (2002) Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* **59**:175–81
- Bibi, I., Bhatti, H. N., Asgher, M. (2009) Decolourisation of Direct Dyes With Manganese Peroxidase From White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*-IBL-5. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* **87**:435-440
- Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., Zhi-Bin, L. (2007) *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review* **13**:265-301
- Borchers, A. T., Stern, J. S., Hackman, R. M., Keen, C. L., Gershwin, M. E. (1999) Minireview: Mushrooms, tumors and immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **221**:281–93
- Chang, S. T., Buswell, J. A. (1996) Mushroom nutraceuticals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**:473–6.

- Chang, S. T., Buswell, J. A. (1999) A mushrooming medicinal mushroom. *International Journal of Medicinal Mushrooms* **1**:139–46
- Chang, S. T., Buswell, J. A. (2008) Safety, quality control and regulational aspects relating to mushroom nutraceuticals. *Mushroom Biology and Mushroom Products* **2008**:188 – 95.
- Chen, D. H., Shiou, W. Y., Wang, K. C., Huang, S. Y., Shie, Y. T., Tsai, C. M., Shie, J. F., Chen, K. D. (1999) Chemotaxonomy of triterpenoid pattern of HPLC of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*. *Journal of the Chinese Chemical Society* **46**:47–51
- Chen, N. H., Liu, J. W., Zhong, J. J. (2008) Ganoderic acid Me inhibits tumor invasion through down-regulating matrix metalloproteinases 2/9 gene expression. *Journal of Pharmacological Sciences* **108**:212–216
- Cheng, C. R., Yue, Q. X., Wu, Z. Y., Song, X. Y., Tao, S. J., Wu, X. H., Xu, P. P., Liu, X., Guan, S. H., Guo, D. A. (2010) Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* **71**:1579–1585
- Cheung, L. M., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C. (2003) Antioxidant activity and total phenolic of edible mushroom extracts. *Food Chemistry* **81**: 249-255
- Ferreira, I. C. F. R., Vaz, J. A., Vasconcelos, M. H., Martins, A. (2010) Compounds from wild mushrooms with antitumor potential, 5. izd., Bentham Science Publishers. str. 424-436
- Gonzalez, A. G., Leon, F., Rivera, A., Munoz, C. M., Bermejo, J. (1999) Lanostanoid triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Natural Products* **62**:1700–1
- Haralampidis, K., Trojanowska, M., Osbourn, A. E. (2002) Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* **75**:31–49
- Hijikata, Y., Yamada, S. (1998) Effect of *Ganoderma lucidum* on postherpetic neuralgia. *The American Journal of Chinese Medicine* **26(3-4)**:375-381

Hikino, H., Ishiyama, M., Suzuki, Y., Konno, C. (1989) Mechanisms of hypoglycemic activity of ganoderan B: a glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Medica* **55(5)**:423-428

Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y., Hayashi, T. (1985) Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Medica* **4**:339–40

Hong, K. J., Dunn, D. M., Shen, C. L., Pence, B. C. (2004) Effects of *Ganoderma lucidum* on Apoptotic and Anti-inflammatory Function in HT-29 Human Colonic Carcinoma Cells. *Phytotherapy Research* **18**:768-770

Jiang, J., Grieb, B., Thyagarajan, A., Sliva, D. (2008) Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer cells by modulating AP-1 and NF-kappaB signaling. *International Journal of Molecular Medicine* **21(5)**:577– 584

Kim, D. H., Shim, S. B., Kim, N. J., Jang, I. S. (1999) Beta-glucuronidase-inhibitory activity and hepatoprotective effect of *Ganoderma lucidum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **22(2)**:162-164

Komoda, Y., Shimizu, M., Sonoda, Y., Sato, Y. (1989) Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **37(2)**:531-533

Kubota, T., Asaka, Y., Miura, I., Mori, H. (1982) Structures of ganoderic acids A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Helvetica Chimica Acta* **65**:611–9

Lee, S. Y., Rhee, H. M. (1990) Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum*: inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its hypotensive action. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **38(5)**:1359-1364

Ma, J., Ye, Q., Hua, Y., Zhang, D., Cooper, R., Chang, M. N., Chang, J. Y., Sun, H. H. (2002) New lanostanoids from the mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Natural Products* **65**:72–5

- Mahato, S. B., Sen, S. (1997) Advances in triterpenoid research, 1990-1994. *Phytochemistry* **44**:1185–236
- Mashour, N. K., Lin, G. I., Frishman, W. H. (1998) Herbal medicine for the treatment of cardiovascular disease: Clinical considerations. *Archives of Internal Medicine* **158**:2225–34
- Mau, J. L., Lin, H. C., Chen, C. C. (2001) Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International* **34**:521–6
- McMeekin, D. (2005) The perception of *Ganoderma lucidum* in Chinese and Western culture. *Mycologist* **18**:165–9
- Miyazaki, T., Nishijima, M. (1981) Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **29**:3611–16
- Muller, C. I., Kumagai, T., O'Kelly, J., Seeram, N. P., Heber, D., Koeffler, H. P. (2006) *Ganoderma lucidum* causes apoptosis in leukemia, lymphoma and multiple myeloma cells. *Leukemia Research* **30**:841-848
- Nishitoba, T., Sato, H., Kasai, T., Kawagishi, H., Sakamura, S. (1984) New bitter C27 and C30 terpenoids from fungus *Ganoderma lucidum* (*Reishi*). *Agricultural and biological chemistry* **48**:2905–7
- Oyaizu, M. (1986) Studies on products of browning reactions. Antioxidative activities of products of browning reactions prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, str. 307-315.
- Riu, H., Roig, G., Sancho, J. (1997) Production of carpophores of *Lentinus edodes* and *Ganoderma lucidum* grown on cork residues. *Sociedad Española de Microbiología: SEM Microbiología* **13**:185–92

- Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Baghel, R. K., Prasad, G. B., Bisen, P. S. (2009) *Ganoderma lucidum*: A potent pharmacological macrofungus. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **10(8)**:717–42
- Sato, H., Nishitoba, T., Shirasu, S., Oda, K., Sakamura, S. (1986) Ganoderiol A and B, new triterpenoids from the fungus *Ganoderma lucidum* (Reishi). *Agricultural and Biological Chemistry* **50**:2887–90
- Silva, D. D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Alias, S. A., Hyde, K. D. (2013) Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity* **62**:1–40
- Sliva, D., Sedlak, M., Slivova, V., Valachovicova, T., Lloyd, F. P., Ho, N. W. Y. (2003) Biologic Activity of Spores and Dried Powder from *Ganoderma lucidum* for the Inhibition of Highly Invasive Human Breast and Prostate Cancer Cells. *The Journal of Alternative and Complementary medicine* **9**:491-497
- Smith, J. E., Rowan, N. J., Sullivan, R. (2002) Medicinal mushrooms: A rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters* **24**: 1839-1845
- Su, C. H., Yang, Y. Z., Ho, H., Hu, C. H., Sheu, M. T. (2001) High-performance liquid chromatographic analysis for the characterization of triterpenoids from *Ganoderma*. *Journal of Chromatographic Science* **39**:93–100
- Tang, W., Gu, T., Zhong, J. J. (2006) Separation of targeted ganoderic acids from *Ganoderma lucidum* by reversed phase liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometry detections. *Biochemical Engineering Journal* **32**:205–210
- Tang, Y. J., Zhu, L. W., Li, H. M., Li, D. S. (2007) Submerged Culture of Mushrooms in Bioreactors-Challenges, Current State-of-the-Art, and Future Prospects. *Food Technology and Biotechnology* **45**:221-229

- Tao, J., Feng, K. Y. (1990) Experimental and clinical studies on inhibitory effect of *Ganoderma lucidum* on platelet aggregation. *Journal of Tongji Medical University* **10**(4):240-243
- Tomoda, M., Gonda, R., Kasahara, Y., Hikino, H. (1986) Glycan structures of ganoderans B and C, hypoglycemic glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Phytochemistry* **25**:2817–20
- Tseng, Y. H., Mau, J. L. (2007) Antioxidant properties of cold water extracts from *Ganoderma tsugae*. *Fungal Science* **22**(1,2): 13-23
- Upton, R. (2000) American Herbal Pharmacopeia and Therapeutic Compendium: *Reishi* Mushroom, *Ganoderma lucidum*. Standards of Analysis, Quality Control and Therapeutics. str. 2–24.
- Wachtel-Galor, S., Buswell, J. A., Tomlinson, B., Benzie, I. F. F. (2004) *Lingzhi* polyphorous fungus. In: Herbal and Traditional Medicine: Molecular Aspects of Health. New York: Marcel Dekker, Inc. str. 179 – 228.
- Wang, S. Y., Hsu, M. L., Hsu, H. C., Tzeng, C. H., Lee, S. S., Shiao, M. S., Ho, C. K. (1997) The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *International Journal of Cancer* **70**(6):699-705
- Wang, Y. Y., Khoo, K. H., Chen, S. T., Lin, C. C., Wong, C. H., Lin, C. H. (2002) Studies on the immunomodulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (*Reishi*) polysaccharides: Functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **10**:1057–62
- Wang, Z., Chen, P., Xien, P. (1999) History and Development of Traditional Chinese Medicine **269**:60-61
- Wasser, S. P., Weis, A. L. (1997) Medicinal Mushrooms *Ganoderma lucidum*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, Peledfus Publishing House, Inc. str. 39

- Wasser, S. P., Weis, A. L. (1999) Therapeutic effects of substances occurring in higher *Basidiomycetes* mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology* **19**(1):65-96
- Wasser, S. P., Coates, P., Blackman, M., Cragg, G., Levine, M., Moss, J., White, J. (2005) *Reishi* or *Lingzhi* (*Ganoderma lucidum*). Encyclopedia of Dietary Supplements. New York: Marcel Dekker, Inc. str. 680 – 90.
- Weng, C. J., Chau, C. F., Chen, K. D., Chen, D. H., Yen, G. C. (2007) The antiinvasive effect of lucidenic acids isolated from a new *Ganoderma lucidum* strain. *Molecular Nutrition & Food Research* **51**(12):1472–1477
- Wong, S. S. (2003) Red *Reishi*: How an ancient herbal treasure can benefit your health today, 1. izd., World Health Publishing Inc. str. 9 – 29
- Woo, Y. A., Kim, H. J., Cho, J. H., Chung, H. (1999) Discrimination of herbal medicines according to geographical origin with near infrared reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **21**:407–13.
- Wu, G. S., Lu, J. J., Guo, J. J., Li, Y. B., Tan W., Dang, Y. Y., Zhong, Z. F., Xu, Z. T., Chen, X. P., Wang, Y. T. (2012) Ganoderic acid DM, a natural triterpenoid, induces DNA damage, G1 cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells. *Fitoterapia* **83**(2):408–414
- Xu, K., Liang, X., Gao, F., Zhong, J., Liu, J. (2010) Antimetastatic effect of ganoderic acid T in vitro through inhibition of cancer cell invasion. *Process Biochemistry* **45**:1261–1267
- Yang, J. H., Lin, H. C., Mau, J. L. (2002) Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* **77**: 229-235.
- Yang, F. C., Liao, C. B. (1998) The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process Biochemistry* **33**:547–53
- Yim, H. S., Chye, F. Y., Ho, S. K., Ho, C. W. (2009) Phenolic profiles of selected edible mushrooms as affected by extraction solvent, time and temperature. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* **2**: 392-401.

Zhou, X., Lin, J., Yin, Y., zhao, J., Sun, X., Tang, K. (2007) *Ganodermataceae*: Natural products and their related pharmacological functions. *The American Journal of Chinese Medicine* **35**:559-74

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Agnes Domic

Ime i prezime studenta
